試験研究用　　マニュアル 2014/10

AMV Reverse Transcriptase for Genie® III
製品コード: NE6011

【はじめにお読み下さい】

このたびは、**AMV Reverse Transcriptase for Genie® III** をお買い上げ頂き、誠にありがとうございます。このマニュアルをよくお読みの上、正しい方法で試薬を使用して下さい。

使用上の注意

1. 本品は、**Isothermal Master Mix for Genie® III** と併用して RT-LAMP 法による等温遺伝子増幅を行うための逆転写酵素です。
2. 本品は、試薬（試験研究用）として販売しているものです。医療行為および臨床診断等の目的では使用できません。
3. 本品は、**等温増幅蛍光測定装置 Genie® III** の専用試薬です。下記 LAMP 法専用リアルタイム濁度測定装置（栄研化学株式会社）には使用できません。
   リアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA®
   リアルタイム濁度測定装置 LA-320C
   リアルタイム濁度測定装置 RT-160C
4. 試薬は-20℃の冷凍庫内に遮光して保存し、納品後 6 ヵ月以内に使用して下さい。
5. 本品を使用する際は、この**マニュアル**の記載内容に従って下さい。記載内容と異なる使用方法および使用目的により発生するトラブルに関しましては、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承下さい。
6. 試験環境の汚染を防ぐため、LAMP 法反応後の増幅産物の電気泳動等の操作およびオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないで下さい。
7. LAMP 法は栄研化学株式会社が特許を保有しています。
8. **AMV Reverse Transcriptase for Genie® III** は、株式会社富士通システムズ・イーストが運営する、**e Genome Order（イーゲノムオーダー）** より販売しています。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせ下さい。
   株式会社富士通システムズ・イースト
   e Genome Order（イーゲノムオーダー）; http://genome.e-mp.jp/

本製品を用いた測定には**等温増幅蛍光測定装置 Genie® III** を使用します。
装置の測定用パラメータの設定に関しては、株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせ下さい。

株式会社ニッポンジーン; http://nippongene-analysis.com/
TEL　076-451-6548
FAX　076-451-6547
E-mail　support@nippongene-analysis.com

I 製品説明

【特長】

AMV Reverse Transcriptase for Genie® III は、大腸菌で発現させた AMV (Avian Myeloblastosis Virus; トリ骨髄芽球症ウイルス) 由来の組換え型逆転写酵素であり、トリ細胞から精製されたネイティブ型の AMV Reverse Transcriptase に比べ RT-LAMP 法において高い活性、感度を示します。

本酵素は RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性、DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性、巻き戻し活性、RNase H 活性を有しています。

Isothermal Master Mix for Genie® III 及び**等温増幅蛍光測定装置 Genie® III** との併用による RT-LAMP 法に適しています。

【LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法】

LAMP法は、一定温度でDNA増幅反応が進行する画期的な技術です。従来の方法と比較して特異性に優れ、またその高いDNA増幅反応効率から、短時間反応および簡易検出が可能である等の利点を有しています。

LAMP法の原理の詳細については、栄研化学株式会社ホームページをご参照下さい。

栄研化学株式会社

Eiken GENOME SITE; http://loopamp.eiken.co.jp/

II 製品内容

製品コード	内容	包装単位	内容量
NE6011	AMV Reverse Transcriptase for Genie® III	600 units	30 µL x 1 本

マニュアル (本紙)　　1 部

取り扱い上の注意

◆ 試薬は-20℃ で暗所にて保存し、納品後 6 ヵ月以内に使用して下さい。
使用後、残った試薬は再度-20℃で保存して下さい。

III 必要な器具、機器、試薬

関連製品

製品コード	内容	包装単位	内容量
NE5011	等温増幅蛍光測定装置 Genie® III	1 台	–
NE5101	Isothermal Master Mix for Genie® III	200 反応用	750 µL x 4 本
NE5103		400 反応用	750 µL x 8 本
NE5201	Genie® III Tube Strip	50 strips	50 strips x 1 袋
NE5203		250 strips	50 strips x 5 袋
NE5301	Genie® III Cooling Block	1 個	–

その他必要な器具など

- マイクロピペット（0.5–10 µL、10–100 µL、100–1,000 µL）
- フィルター付マイクロチップ（滅菌済）
- マスターミックス調製用チューブ（1.5 mL あるいは 2.0 mL）
- 氷（クラッシュアイス）
- ピンセット（核酸の汚染がないもの）
- チューブラック
- ボルテックスミキサー
- 簡易遠心機（1.5 mL チューブ用および Genie® III Tube Strip 用）
- 滅菌水（RNase-free）

Ⅳ 使用方法

【試験を行う前の準備および注意】

器具、機器の準備

■ 等温増幅蛍光測定装置 Genie® Ⅲ

操作の詳細は装置のマニュアルをご参照下さい。

■ 器具

器具	使用方法
マイクロピペット	原則として各区域専用とし、もし他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻して下さい。
チューブラック	原則として各区域専用とし、もし他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻して下さい。
チューブ	市販のガンマ線滅菌済チューブ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択して下さい。
フィルター付マイクロチップ（滅菌済）	市販のガンマ線滅菌済疎水性フィルター付チップ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択し、各区域にて開封して下さい。また、連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、1 回ごとに使い捨てとして使用して下さい。
筆記用具	各区域専用とし、持込書類を置く専用のスペースを確保して下さい。
手袋	使い捨てとし、汚染が疑われる場合はすぐに手袋を交換して下さい。
白衣	各区域専用とし、袖口からの汚染に注意して下さい。

試験環境

LAMP 法は高感度な DNA 増幅技術であるため、試験環境に陽性コントロール（DNA ないし RNA）や LAMP 法反応後の増幅産物等、鋳型となる核酸の汚染が発生すると、以降正確な試験を行うことが困難になります。サンプルの取り扱いにおいては、作業用の着衣および器具への付着に十分注意し、着衣の交換を徹底して下さい。以後の試験における誤判定を防止するため、使用済みのチップ、チューブ、LAMP 法反応後サンプルは二重にしたビニール袋にまとめて廃棄して下さい。また、LAMP 法反応後の増幅産物（サンプルおよび陽性コントロール）の電気泳動等による操作およびオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないで下さい。

作業区域

核酸抽出および核酸増幅を実施していない（核酸による汚染が存在しない）クリーンベンチあるいは作業台を試薬調製作業区域とし、マスターミックスは試薬調製作業区域にて作製して下さい。試薬調製作業区域では陽性コントロールおよび LAMP 法において鋳型となる核酸を含む溶液、試薬類の取り扱いは行わないで下さい。

マスターミックスへのサンプルおよび陽性コントロールの添加を行うスペースは試薬調製作業区域と区分し、専用の核酸取扱区域を設けて下さい。

■ 核酸除去操作

器具は常に清潔に保って下さい。洗浄が可能である器具は大量の水道水でよく濯ぐことにより、付着した核酸を希釈、除去できます。

高濃度の核酸を取扱った場合など、核酸による汚染が疑われるような場合には、0.5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて試験環境中に存在する核酸の除去操作を行います。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は塩素ガスを発生するので、使用の際には換気に十分注意して下さい。また、金属に対する腐食性があるため、金属に対して使用する際は、迅速に塩素成分を拭き取る等の対応が必要です。高温環境下における劣化が著しいため、0.5%水溶液調製後の経過日数や保存温度に注意して下さい。

非金属の器具は次亜塩素酸ナトリウム水溶液に1時間以上浸し、よく濯いで乾燥します。作業台、器具は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液による拭き取り清掃を行います。

＜詳細な核酸除去方法＞

i) 使い捨て手袋を装着します。
ii) 有効塩素濃度 5,000 ppm (0.5%) の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を準備します。
iii) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたペーパータオルで作業台、器具を丁寧に拭き、5 分間そのまま放置します。
iv) 5 分間の処理が終了したら塩素成分をペーパータオルで拭き取り、その後、蒸留水等核酸の混入がない水を含ませたペーパータオルで確実に塩素成分を除去します。

【プロトコル】

1. RNA サンプルの調製

1-1. RNA サンプルの調製

あらかじめ、対象ごとに適した方法を用いてRNAを調製して下さい。

> 重要
> 試験環境の汚染を避けるため RNA 調製は本品を使用する区域とは区別して行って下さい。

2. マスターミックス調製および反応

2-1. 試薬の融解

本品を室温で完全に融解します。

2-2. 混合とスピンダウン

試薬をボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回混合して均一にした後、スピンダウンを行い、試薬を氷上に静置します。

2-3. マスターミックスの作製

マスターミックス調製用チューブ（1.5 mL あるいは 2.0 mL）に下表の試薬を必要テスト数分ずつ分注し、ボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回混合した後、スピンダウンを行います。これをマスターミックスとし、氷上に静置します。1 反応 25.0 µl あたり、本品を 0.1 から 0.25 units 程度添加して下さい。

例:　マスターミックスの作製

試薬	1 テスト分
Isothermal Master Mix for Genie® III	15.0 µL
AMV Reverse Transcriptase for Genie® III	0.1–0.25 units
プライマーミックス	
マスターミックス合計	20.0 µL

2-4. マスターミックスの分注

Genie® III Tube Strip を袋から取り出し、Genie® III Cooling Block に立て、マスターミックスを 20.0 µL ずつ分注します（Genie® III Tube Strip を袋から取り出す際には、核酸の汚染がないピンセットを準備し、使用して下さい）。

2-5. サンプルの添加

まず、陰性コントロール用のウェルに陰性コントロール（滅菌蒸留水等）を 5.0 µL 添加してキャップを閉じます。次に、サンプル反応用のウェルに 1-1.で調製した RNA サンプルを 5.0 µL 添加してキャップを閉じます。最後に、陽性コントロール用のウェルに陽性コントロールを 5.0 µL 添加してキャップを閉じます。

2-6. 反応

反応の前に RNA サンプルとマスターミックスを混合します。全てのキャップを閉じた状態で転倒混和により混合した後、スピンダウンを行い、**等温増幅蛍光測定装置 Genie® III** にセットして測定（遺伝子増幅モニタリング及び会合曲線解析）を開始します。

> 重要
> 混合の際は気泡が発生しないように注意して下さい。

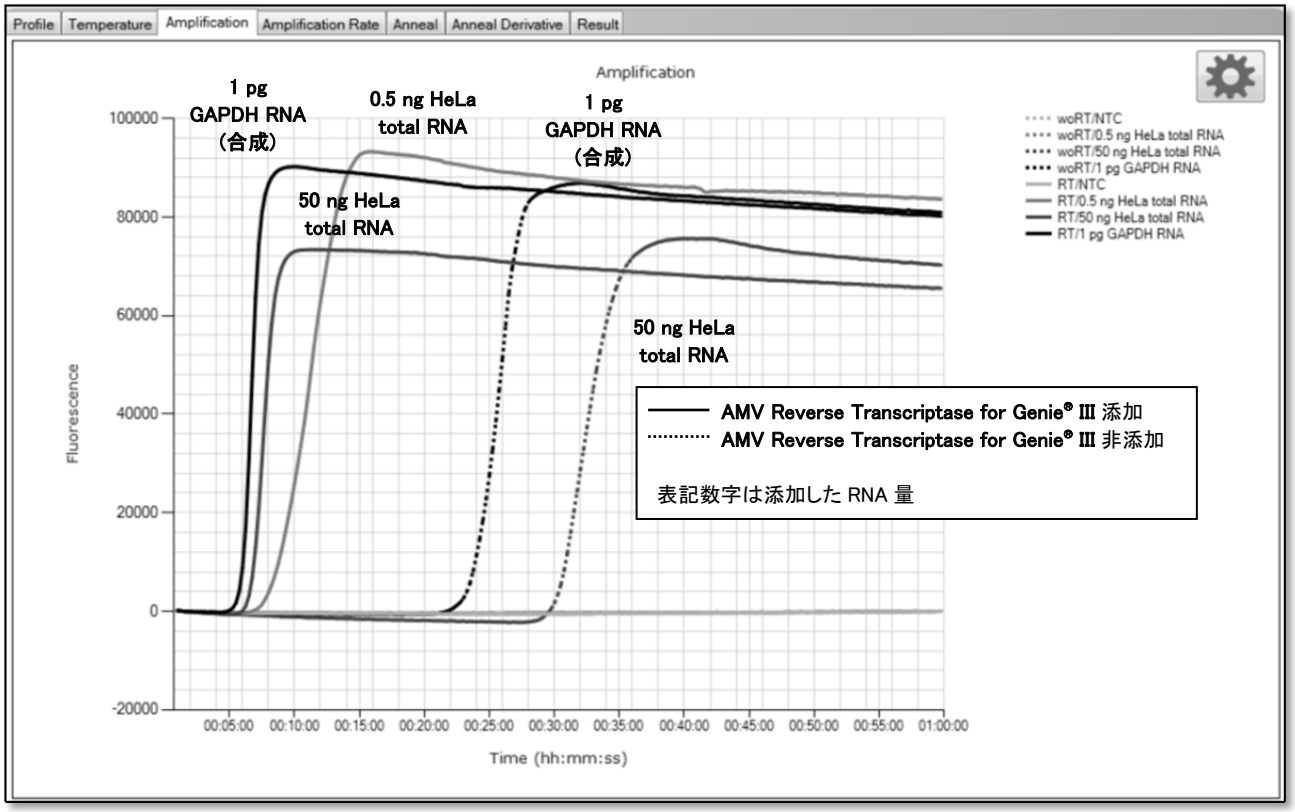

図: 本品と **Isothermal Master Mix for Genie® III** 及び**等温増幅蛍光測定装置 Genie® III** との併用による RT-LAMP 法の測定結果

【ヒト GAPDH mRNA 検出用プライマーを用いた mRNA の高感度検出】

HeLa 細胞から AGPC 法により total RNA を抽出し、RT-LAMP 法に供した。本品の使用により、抽出 RNA から GAPDH mRNA を高速に検出できた。
＊ポジティブコントロールとして、人工合成したヒト GAPDH RNA を同時に検出した。

本品を使用しなかった場合、0.5 ng の total RNA からは GAPDH mRNA を検出できなかった。
データは**等温増幅蛍光測定装置 Genie® III** 専用ソフトウェアである **Genie® Explorer** を使用して解析した。

V トラブルシューティング

本品の使用において何らかの問題が発生した場合は、以下の項目に従って対処して下さい。その他の不明な点については株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせ下さい。

問題点	原因および対処法
陰性コントロールが正確な結果を示さない（蛍光が上昇している）	**A. 試薬あるいは試験環境に汚染が存在する。** 陰性コントロールで増幅が起こっている場合、鋳型となる核酸の混入が疑われます。会合曲線解析の結果を参照するとともに、試薬および試験環境の汚染モニタリング、0.5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による器具、機器類の拭き取り操作を行い、汚染を完全に除去した後に試験を実施して下さい。 **B. 反応温度、操作手順に誤りがある。** 反応の工程で問題が発生していないか確認して下さい。
陽性コントロールが正確な結果を示さない（蛍光が上昇しない）	**A. RNA サンプルの添加量が過剰である。** RNA サンプルの添加量が過剰であるとマスターミックスが希釈され反応効率が低下する場合がありますので、添加量はマニュアルの指示に従って下さい。 **B. 反応温度、操作手順に誤りがある。** 反応の工程で問題が発生していないか確認して下さい。
試薬が不足する	**A. チューブ内壁に試薬が飛散、付着している。** 使用前にスピンダウンを行って下さい。 **B. 保存中に試薬が蒸発している。** 使用後はキャップを完全に閉じて下さい。

VI 参考文献・資料

1. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28** (12): e63

2. Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* **12** (3): 358

・ 記載内容や製品仕様、価格に関しては予告無しに変更する場合があります。
・ 本マニュアルの記載内容は2014年10月現在のものです。最新のマニュアルは株式会社ニッポンジーンホームページからダウンロードして下さい。
・ 「ニッポンジーン®」および「NIPPON GENE®」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。
・ その他、製品名等の固有名詞は各社の商標あるいは登録商標です。
・ 記載内容の複製、転載を禁止します。

本品に関するお問い合わせ先	
株式会社ニッポンジーン	
TEL	076-451-6548
FAX	076-451-6547
E-mail	support@nippongene-analysis.com
URL	http://nippongene-analysis.com

ご購入に関するお問い合わせ先	
株式会社富士通システムズ・イースト	
TEL	03-5977-5573
FAX	03-5977-5574
E-mail	feast-egenome@cs.jp.fujitsu.com
URL	http://genome.e-mp.jp

Copyright © 2014 NIPPON GENE CO., LTD. All Rights Reserved.